

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITE DE CLERMONT-FERRAND II

(U.E.R. "SCIENCES EXACTES ET NATURELLES A DOMINANTE RECHERCHE")

POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Claude ANDRIVON

ETUDE DU SYSTEME DE REGULATION DE LA PERMEABILITE A L'ION NICKEL

CHEZ PARAMECIUM ET DE SES RAPPORTS AVEC LE CHENAL CALCIQUE D'EXCITATION.

SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 24 JUIN 1978 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM.	H. LUTZ	Président
	P. de PUYTORAC	
	E. SCHOFFENIELS	} Examineurs
	R. DURAND	
Mme	J. BEISSON	
MM.	M. LAZDUNSKI	) Rapporteurs
	C. KUNG	

RESUME

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITE DE CLERMONT-FERRAND II

(U.E.R. "SCIENCES EXACTES ET NATURELLES A DOMINANTE RECHERCHE")

POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Claude ANDRIVON

ETUDE DU SYSTEME DE REGULATION DE LA PERMEABILITE A L'ION NICKEL
CHEZ PARAMECIUM ET DE SES RAPPORTS AVEC LE CHENAL CALCIQUE D'EXCITATION.

SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 24 JUIN 1978 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM.	H. LUTZ	Président
	P. de PUYTORAC	
	E. SCHOFFENIELS	} Examineurs
	R. DURAND	
Mme	J. BEISSON	
MM.	M. LAZDUNSKI	) Rapporteurs
	C. KUNG	

RÉSUMÉ



INTRODUCTION

La mise en évidence puis l'étude d'un système membranaire de pénétration de l'ion Ni^{++} chez *Paramecium caudatum* et *Paramecium aurelia* a été effectuée par des approches très diverses :

- mesures de flux ioniques,
- étude des propriétés de modèles de Paramécies extraits au Triton X-100,
- techniques de microscopie électronique appliquées à la révélation de sites intracellulaires de fixation des ions,
- utilisation d'inhibiteurs du métabolisme intermédiaire et des synthèses protéiques,
- étude des phénomènes d'antagonisme entre les ions K^+ , Ca^{++} , Co^{++} , Ni^{++} ,
- sélection, caractérisation et analyse génétique de mutants hyper-résistant au nickel,
- étude de la perméabilité à cet ion de mutants à anomalies d'excitabilité,
- étude des rapports d'expression phénotypique entre plusieurs gènes mutés,
- techniques biochimiques de recherche des cholinestérases et des ATPases activées par les ions,
- techniques de fractionnement cellulaire, en particulier d'isolement des membranes ciliaires.

L'analyse globale de ces résultats expérimentaux très divers nous a permis de montrer l'existence d'un chenal membranaire de pénétration du Ni^{++} dans la cellule confondu avec le chenal calcique d'excitation et d'étudier, par ce moyen, le système excitable de la membrane de la Paramécie et quelques aspects de son architecture et de son fonctionnement.

MATERIEL ET METHODES

I - ESPECES DE PARAMECIES UTILISEES

a) *Paramecium caudatum* , variété 3 mating-type 5.

b) *Paramecium tetraurelia* "stock" 51 mating-type 7 (= *Paramecium aurelia*, variété 4; voir SONNEBORN, 1975)

II - TECHNIQUES DE CULTURE ET D'UTILISATION DES PARAMECIES

1°) Conservation des souches

- *Paramecium caudatum* est conservée dans des tubes à culture contenant du milieu au blé, les repiquages étant effectués tous les mois.
- *Paramecium tetraurelia* et les souches mutantes qui en sont issues sont conservées à la température du laboratoire, dans des tubes contenant du milieu au cérophyl.

2°) Cultures pour expériences de physiologie

Des individus isolés des cultures précédentes sont d'abord placés dans des concavités emplies du milieu de culture. Les clones dont le développement a été le meilleur sont repiqués dans des tubes et cultivés ensuite régulièrement suivant les besoins des expériences. Les Paramécies sont utilisées lorsque la croissance de la population atteint le stade du plateau.

3°) Cultures en masse pour études biochimiques

Le contenu d'un ou plusieurs tubes de culture est repiqué dans des Erlenmeyer ou des ballons de 250, 1000, 2000 ou 5000 ml, suivant les besoins, remplis au 1/3 environ de milieu de culture.

4°) Cultures pour analyse génétique

Les cellules sont cultivées dans des lames à trois concavités dont le volume individuel est de l'ordre de 1 ml.

III - QUANTIFICATION DE L'EFFET IMMOBILISATEUR DU NICKEL. DEFINITION ET DETERMINATION DE LA RESISTANCE D'UNE POPULATION DE PARAMECIES A UNE CONCENTRATION DETERMINEE DE CET ION.

L'effet du Ni^{++} le plus facilement observable est l'inhibition des mouvements ciliaires des Paramécies donc l'immobilisation des ciliés.

Il est donc possible de caractériser avec une assez grande précision, chaque individu par le temps t_i exprimé en secondes : "résistance individuelle à la concentration C donnée de nickel". On

peut alors affecter à une population de Paramécies une résistance au Ni^{++} $t = \frac{t_i}{30}$ moyenne des résistances individuelles d'un échantillon de 30

30 individus prélevés au hasard dans cette population.

Une estimation plus rapide de la résistance des clones de Paramécies est utilisée pour caractériser les différents mutants résistant au nickel. 10 cellules sont placées sur une lame, dans une goutte d'une solution de Ni^{++} de concentration déterminée. On observe au bout d'un temps donné, leur comportement, et on leur affecte une caractéristique simple.

Ex : - souche sauvage : 100% des individus stoppés en moins de 2 mn 30 s dans une solution de $NiCl_2$ 10^{-5} M dans du tampon Tris HCl 10mM pH 7,2. Signe caractéristique : -

- souche Nir10 : pas d'arrêt dans les mêmes conditions.
Signe caractéristique : +++

On dispose ainsi d'une batterie de signes -, ±, +, ++, +++, correspondant à une estimation grossière de la résistance (V. Protocole XV B, 6-7-8-9).

IV - L'EMPLOI DU Ni^{++} : RECHERCHE D'UN MILIEU CONVENABLE

Nous avons utilisé 3 milieux pour réaliser les solutions de chlorure de Ni^{++}

- 1) l'eau distillée peptonée à 2%.
- 2) l'eau distillée glucosée à 2%.
- 3) le tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,2

La gamme des concentrations actives se situe alors entre 2×10^{-6} M et 5×10^{-5} M pour *P. caudatum*. Elle est légèrement plus faible pour *P. aurelia*. Elle est la même que dans le milieu glucosé et que dans l'eau distillée. Il faut la multiplier par 100 avec le milieu peptoné et par 10 à 100 en présence de Ca^{++} et K^+ .

V - VARIABILITE DE LA RESISTANCE AU Ni^{++} ET PRECAUTION A PRENDRE
DANS L'UTILISATION DES PARAMECIES

VI - DETERMINATION DE L'EXCITABILITE DES PARAMECIES

1°) Différents types de mouvements effectués par une Paramécie

- a) le mouvement normal ou "forward left spiralling" ou FLS.
- b) la spirale avant droite ou "forward right spiralling" ou FRS
- c) le renversement ciliaire continu ou "continuous ciliary reversal" ou CCR
- d) le renversement ciliaire périodique ou "periodic ciliary reversal" ou PCR
- e) le renversement ciliaire partiel ou "partial ciliary reversal" ou PaCR

2°) Estimation pratique de l'excitabilité

Des variations d'excitabilité de la cellule se traduisent par des modifications dans la nature ou la durée de la réponse obtenue dans une solution de stimulation donnée; celle-là a été appréciée par la nature et la durée de certains mouvements effectués par le cilié placé dans des milieux contenant des concentrations précises de certains ions (Ca^{++} , K^+ , Ba^{++} ; Na^+).

VII - TECHNIQUES SPECIFIQUES A CHAQUE TYPE DE MANIPULATION

Elles sont exposées dans le volume II "Protocoles expérimentaux", en regard de chaque expérience et des résultats obtenus.

CHAPITRE I : LE MODE D'ACTION DU NICKEL SUR *PARAMECIUM* ET LES DIFFERENTS FACTEURS QUI L'AFPECTENT

I - LES DIFFERENTS EFFETS DU NICKEL SUR PARAMECIUM

1°) *Le nickel immobilise les Ciliés par arrêt des mouvements de leurs cils*

2°) *Réversibilité de l'effet immobilisateur du Ni^{++}*

L'immobilisation des ciliés par le nickel est réversible. Lavés et placés dans un milieu approprié (milieu de culture ou milieu à la peptone 2%.par exemple) ils peuvent reprendre leur mouvement. Ce retour à la normale est lent et étroitement dépendant du temps de séjour dans la solution de Ni^{++} et de la concentration de cette dernière. Il est le résultat de l'élimination du Ni^{++} hors de la cellule. L'utilisation de certains complexants du Ni^{++} améliore de façon spectaculaire le résultat (Expériences 3a et 3b) en réduisant très fortement le temps nécessaire à la reprise des mouvements. L'emploi de la diméthylglyoxyme permet de distinguer 3 phases progressives dans l'action du Ni^{++} (protocole III expérience 3b) :

- blocage du mouvement ciliaire sans altération de la possibilité de récupération.

- blocage du mouvement ciliaire avec inhibition de cette possibilité de récupération.

- intoxication générale conduisant à la mort.

3°) *Le nickel inverse le sens du mouvement spiral décrit par la Paramécie.*

4°) *Les autres effets du nickel sur la Paramécie*

II - LES FACTEURS AFFECTANT LA RESISTANCE AU Ni^{++}

1°) *La concentration externe du Ni^{++}*

La résistance t décroît quand la concentration C de Ni^{++} croît et ce jusqu'à une valeur minimale qui ne varie plus.

2°) Le pH

La résistance au Ni^{++} passe chez *P. caudatum* par un minimum vers pH 5 à 5,5.

3°) La température

La résistance au Ni^{++} passe par un minimum situé vers 26°-27°.

4°) La présence d'ions antagonistes.

Ca^{++} , K^+ , Mg^{++} , Sr^{++} , Ba^{++} , Mn^{++} et Co^{++} accroissent fortement la résistance au Ni^{++} .

5°) Le métabolisme cellulaire

Sa réduction entraîne une forte augmentation de la résistance au Ni^{++} .

CHAPITRE II : PENETRATION ET CONCENTRATION DU NICKEL DANS LA CELLULE. LE ROLE DE LA MEMBRANE CELLULAIRE.

I - INTRODUCTION GENERALE :

II - LE NICKEL DOIT PENETRER DANS LA CELLULE POUR STOPPER LE MOUVEMENT CILIAIRE

1°) Le mode d'action du Ni^{++} sur le mouvement ciliaire se distingue très nettement du mode d'action d'ions dont on sait qu'ils agissent en se fixant sur la face externe de la membrane (K^+ , Ca^{++} , Na^+ , Ba^{++})

2°) L'étude de l'élimination du Ni^{++} fixé par les Paramécies met en évidence un compartiment d'échange lent.

La représentation des données expérimentales en coordonnées semi-logarithmiques (graphique 2b) indique l'existence d'au moins 2 compartiments :

- l'un d'échange rapide
- l'autre d'échange lent qui est celui qui détermine l'action du Ni^{++}

3°) L'action de chélatants du Ni^{++} , de forces différentes, sur la restauration de la nage chez des Paramécies stoppées par le Ni^{++} est d'autant plus efficace que les chélatants traversent mieux la membrane

4°) *Le Ni^{++} est capable de stopper les mouvements ciliaires de modèles de Paramécies*

La suppression de la membrane n'entraîne pas celle de l'action du Ni^{++} . Au contraire l'un des obstacles qui la limitait disparaît.

5°) *Les inhibiteurs du métabolisme énergétique augmentent fortement la résistance au Ni^{++}*

6°) *Les sites de fixation du Ni^{++} sont localisés à la base des cils*

4 localisations principales apparaissent

- au niveau de la plaque terminale.
- au niveau du septum et parfois de l'axosome.
- sous la membrane ciliaire au niveau des "patches".
- dans la matrice ciliaire mais uniquement vers la partie basale du cil.

7°) *Conclusion*

Le cheminement de l'ion Ni^{++} depuis le milieu extérieur peut donc être ainsi schématisé:

- fixation à la surface externe de la membrane
- translocation à travers la membrane cellulaire,
- fixation sur des sites intraciliaires, sites dont l'occupation entraîne le dysfonctionnement et le blocage du mouvement ciliaire.

III - LE NICKEL EST CONCENTRE DANS LA CELLULE.

Trois types d'expériences ont permis de montrer que le Ni^{++} est accumulé dans la cellule ou dans certains compartiments cellulaires à une concentration plusieurs fois supérieure à la concentration extérieure (500 à 600 fois)

1°) *L'étude de l'élimination du Ni^{++} radioactif absorbé par les Paramécies en présence de Ni^{++} non radioactif dans le milieu de récupération*

2°) *La mesure des quantités de Ni^{++} radioactif fixé par les Paramécies*

3°) *La mesure de la résistance au Ni^{++} des modèles de Paramécies extraits au Triton X - 100*

4°) *Conclusion*

IV - CONCENTRATION DU Ni^{++} , ARRET DU MOUVEMENT CILIAIRE : DEMONSTRATION DU ROLE PRIMORDIAL DE LA MEMBRANE

1°) La pénétration du Ni^{++} n'est pas un simple phénomène passif

a) - une diffusion simple des ions Ni^{++} à travers la membrane, même associée à leur fixation sur des sites internes ne permet pas d'expliquer leur accumulation dans la cellule.

b) - Les mouvements du Ni^{++} sont préférentiellement orientés de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule.

2°) La membrane joue le rôle essentiel dans le contrôle de la pénétration du nickel.

a) - une membrane fonctionnelle est nécessaire pour expliquer la concentration du Ni^{++} dans la cellule et certaines caractéristiques de sa pénétration.

b) - le nickel interfère avec certains phénomènes membranaires.

c) - des anomalies de la membrane entraînent des anomalies de la pénétration du Ni^{++} (mutants possédant une résistance au Ni^{++} ou mutants à anomalies de comportement)

d) - Conclusion Cela suppose l'existence, au niveau de cette membrane, d'un mécanisme particulier facilitant la pénétration du Ni^{++} , orienté de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule et capable de sélectionner préférentiellement cet ion.

CHAPITRE III : LES PROPRIETES DU SYSTEME MEMBRANAIRE ASSURANT LA PENETRATION DU NICKEL

I - CINETIQUE DE PENETRATION DU Ni^{++} : SATURABILITE ET SPECIFICITE DU SYSTEME

1°) Définition et mesure de la vitesse initiale de pénétration du nickel (V_i) (Protocole expérimental V, expériences 5a, 5c, 5d)

Deux méthodes permettent de l'évaluer.

- la mesure de la quantité Q de Ni^{++} radioactif absorbée pendant un certain temps : θ ; V_i est alors égale à Q/θ

- la mesure de la résistance t au nickel : V_i est égale à $1/t$.

2°) *Etude de la relation entre la vitesse initiale V_i de pénétration et la concentration du Ni^{++} dans le milieu extérieur.*

La représentation graphique en coordonnées directes se traduit par un faisceau de courbes de 2 types :

- des hyperboles équilatères observées chez les Paramécies que nous dénommerons plus loin P_{Ca} sur le vu des variations de leur résistance au Ni^{++} en présence de Ca^{++} .

Dans ce cas, la représentation des données, en coordonnées inverses, se traduit graphiquement par une droite.

- des sigmoïdes observées chez les Paramécies dénommées P_K sur le vu des variations de leur résistance au Ni^{++} en présence de K^+ .

Dans tous les cas V_i atteint une valeur maximum qui ne varie plus avec la concentration de Ni^{++} .

3°) *L'effet antagoniste du cobalt et du calcium sur la résistance au Ni^{++} .*

En présence de Co^{++} et de Ca^{++} la résistance au Ni^{++} des Paramécies croît fortement. Ces ions sont antagonistes du Ni^{++} parce qu'ils réduisent sa vitesse de pénétration

Ca^{++} , Co^{++} et Ni^{++} entrent en compétition pour l'occupation de sites communs.

4°) *Conclusion*

- la cinétique de pénétration du Ni^{++} revêt des caractéristiques analogues à celle d'une cinétique enzymatique;
- le système est saturable;
- le système possède des sites spécifiques pouvant fixer certains ions qui entrent en compétition pour leur occupation.

II - NATURE PROTEIQUE DU SYSTEME.

1°) *La pénétration du Ni^{++} est contrôlée par des protéines.*

L' intervention au niveau :

- des gènes par mutation,
- de la synthèse des ARN avec l'actinomycine D,
- des ARN eux mêmes par destruction à l'aide de ribonucléase,
- du système de synthèse protéique par action d'inhibiteurs,
- des protéines elles-mêmes par destruction à l'aide de protéases,

se traduit toujours par une forte augmentation de la résistance au Ni^{++} .

La translocation de l'ion Ni^{++} à travers la membrane cellulaire de la Paramécie est placée sous contrôle de protéines renouvelées de façon permanente, rapide (3 à 4 h), à partir d'un pool d'ARN stable, à turn-over lent mais synthétisé de façon permanente.

2°) *La résistance au Ni^{++} et sa cinétique de pénétration dans la cellule sont fortement modifiées par les inhibiteurs de groupes SH.*

3°) *Conclusion .*

La résistance au Ni^{++} est sous contrôle protéique; au moins 7 protéines différentes interviennent. Certaines peuvent être simplement impliquées dans des chaînes de synthèse dont le produit terminal par contre est situé dans la membrane. D'autres peuvent appartenir à des systèmes contrôlant la mise en place d'éléments de la membrane synthétisés par ailleurs. Plusieurs faits permettent de penser que certaines font directement partie du mécanisme intime de translocation du Ni^{++} .

III - LA LIAISON AVEC LE METABOLISME ENERGETIQUE

1°) *Action des inhibiteurs du cycle de Krebs, de la chaîne respiratoire et de la phosphorylation oxydative sur la résistance au Ni^{++} .*

Ils provoquent toujours une forte augmentation de la résistance au Ni^{++} .

2°) *Le problème du mode d'action de l'ATP sur la résistance au Ni^{++} : la pénétration du Ni^{++} est-elle active ?*

Les faits conduisent à éliminer la possibilité d'une intervention directe de l'ATP dans la pénétration du Ni^{++} . L'ATP serait simplement nécessaire pour la synthèse des protéines du système membranaire de translocation de l'ion.

IV - CONFORMATION DU SYSTEME : LE ROLE DES IONS Ca^{++} et K^+ .

1°) Action du Ca^{++} et du K^+ sur la résistance au Ni^{++}

Le Ca^{++} et le K^+ accroissent fortement la résistance au Ni^{++}

Une des caractéristiques importante qui permet de distinguer les Paramécies de type P_K et P_Ca est la relation : V_i de pénétration du $\text{Ni}^{++} = fC_{\text{Ni}}$ (concentration externe de Ni^{++}) c'est à dire la cinétique de pénétration du Ni^{++} . Cette relation se traduit par une hyperbole chez les Paramécies P_K bien caractérisées (courbe I) et par une sigmoïde chez les Paramécies P_Ca bien caractérisées (courbe II).

2°) Action du Ca^{++} ou du K^+ sur la cinétique de pénétration du Ni^{++} .

Les ions Ca^{++} et K^+ sont antagonistes pour déterminer les caractéristiques de la courbe de cinétique de pénétration du Ni^{++} . La sigmoïdité de celle-ci est dépendante des quantités relatives de ces 2 ions présentes dans le milieu extérieur.

3°) Recherche de la nature des 2 effets du Ca^{++} et du K^+ .

La cinétique de pénétration du Ni^{++} dépend du rapport des quantités d'ions K^+ et Ca^{++} fixées à la surface de la membrane. L'antagonisme observé entre K^+ et Ca^{++} résulte de leur antagonisme pour occuper les sites de fixation de la surface de la membrane.

L'effet antagoniste du Ca^{++} vis à vis du Ni^{++} résulte d'un phénomène de compétition pour l'occupation de sites de pénétration dans la cellule. A l'effet du K^+ sur la cinétique de pénétration s'en ajoute un autre sur la pénétration du Ni^{++} lui-même.

4°) Interprétation des modifications des courbes de cinétique de pénétration du Ni^{++} .

Le passage continu du type "hyperbole" au type "sigmoïde" traduit des variations continues dans "l'état" du système membranaire de translocation du Ni^{++} . Les variations observées peuvent être interprétées en termes de changement de conformation.

Les ions K^+ et Ca^{++} fixés à la surface de la cellule sur des sites spécifiques se comportent alors comme des effecteurs allostériques antagonistes. Le système oscille par transition allostérique entre 2 états de conformation extrêmes, l'un stabilisé par le Ca^{++} , l'autre par le K^+ . A un rapport r donné des quantités d'ions K^+ et Ca^{++} fixés sur la face externe du système correspond un état conformationnel donné. La variation de r , par déplacement des ions Ca^{++} ou K^+ , entraîne

une modification de conformation, donc des caractéristiques d'ensemble du système, de l'affinité pour le Ni^{++} des sites de pénétration de cet ion et de sa vitesse de passage à travers la membrane.

Mais, pour un même état de conformation, donc pour un même coefficient d'affinité des sites pour le Ni^{++} , la quantité d'ions Ni fixés par ceux-ci dépend aussi d'un phénomène de compétition avec d'autres ions, en particulier le Ca^{++}

Cette explication suppose l'existence de deux types de sites de fixation des ions sur la système de translocation du Ni^{++} . Les uns sont des sites régulateurs de la conformation de l'ensemble; ils n'interviennent pas directement dans le passage de l'ion à travers la membrane; ils sont situés vers la surface externe et fixent préférentiellement, suivant la loi d'action de masse, les ions Ca^{++} et K^+ . Les autres sont des sites actifs dans la translocation du Ni^{++} ; ils fixent préférentiellement le Ni^{++} , le Ca^{++} et le Co^{++} entre autres.

V - STRUCTURE DU SYSTEME DE PENETRATION DU Ni^{++} : POLYMERIE ET GRANDES COMPOSANTES FONCTIONNELLES..

1°) Etude des relations d'expression des gènes de résistance au Ni^{++}

Il n'y a pas d'épistasie entre les gènes étudiés

Dans un édifice polymutant chacun des gènes s'exprime comme dans la souche monomutante; seules les résistances au Ni^{++} sont additives; il n'y a pas interférence entre les gènes pour les autres caractères.

2°) Etude des anomalies de résistance au Ni^{++} et d'excitabilité liées respectivement aux gènes Nir 10 et Nir 16p.

Les propriétés des sites Nir 16p et Nir 10 sont différentes.

Au moins 2 types de sites servant à la translocation du Ni^{++} peuvent donc être mis en évidence.

3°) Mise en évidence d'unités portant des sites de translocation du Ni^{++} et d'unités de régulation du fonctionnement de ces sites..

L'étude de la résistance au Ni^{++} et de sa régulation par le K^+ chez les mutants Pawn A et Pawn C, de l'action des inhibiteurs de groupes SH sur les modifications de résistance obtenues à l'aide du K^+ , montre qu'on peut découpler la pénétration du Ni^{++} de sa régulation c'est à dire le site Ni des sites allostériques fixant le K^+ et capables d'agir sur lui par transition allostérique.

4°) Conclusion

L'ensemble des expériences précédentes conduit à attribuer au système membranaire assurant la pénétration du Ni^{++} une architecture polymérique mixte: celle d'un dispositif "en file" comportant plusieurs sites actifs de translocation du Ni^{++} associé à un dispositif "en grappe" constitué par une ou des unités de régulation agissant sur un ou plusieurs des sites précédents en modifiant leur conformation et leur affinité pour le Ni^{++} .

VI - CONCLUSION

Le système membranaire de pénétration du Ni^{++} possède donc de nombreuses propriétés d'un système de transport :

La présence de plusieurs sites de translocation du Ni^{++} ; la polymérie observée indiquent que ce système est un chenal emprunté par l'ion depuis un compartiment externe de fixation à la surface de la membrane jusqu'aux sites internes où il agit sur le mouvement ciliaire.

Ce chenal comporte des sites à affinité variable pour le Ni^{++} . La modulation de celle-ci est liée à des changements de conformation d'unités régulatrices susceptibles de fixer des effecteurs allostériques, en particulier le Ca^{++} et le K^+ , qui se comportent comme des effecteurs antagonistes. A un état conformationnel donné correspond une perméabilité donnée et des mouvements d'ions à la fois déterminés par cette perméabilité et par leur gradient de concentration.

Le système oscille entre un état de relaxation hautement perméable au Ni^{++} et un état contraint faiblement perméable au Ni^{++} et instable. La liaison entre les unités actives et les unités régulatrices est assurée par des groupes SH.

CHAPITRE IV : ETUDE DES RAPPORTS ENTRE LE SYSTEME DE PENETRATION DU Ni^{++} ET LE SYSTEME D'EXCITATION DE LA MEMBRANE CHEZ LA PARAMECIE.

I - CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LES PROPRIETES ET LE PHENOMENE D'EXCITATION DE LA MEMBRANE CELLULAIRE DE LA PARAMECIE. RELATIONS AVEC LE MOUVEMENT CILIAIRE.

1°) La membrane au repos

2°) L'excitation de la membrane. Liaison avec le renversement ciliaire

3°) *Succession des événements durant la "réponse calcique" et la repolarisation de la membrane. Liaison avec le renversement ciliaire.*

4°) *Orientation actuelle des recherches*

II - ACTION DU Ni^{++} SUR LE RENVERSEMENT CILIAIRE .

1°) *Le blocage du renversement ciliaire par le Ni^{++} .*

Les expériences décrites dans le Protocole XIII montrent que des concentrations croissantes de Ni^{++} ajoutées au milieu de stimulations réduisent, jusqu'au blocage complet, le CCR déclenché par des solutions de K^+ et Ca^{++} .

2°) *Cause du blocage du renversement ciliaire par le Ni^{++} .*

Le Ni^{++} bloque le renversement ciliaire en bloquant l'influx de Ca^{++} normalement provoqué par la stimulation de la membrane.

3°) *Causes du blocage de l'influx de Ca^{++} par le Ni^{++} .*

Le Ni^{++} agit en occupant les chenaux calciques ouverts par la stimulation empêchant ainsi le Ca^{++} de les emprunter pour pénétrer dans la cellule.

III- CHENAL Ni et CHENAL Ca .

1°) *Comparaison des propriétés des chenaux Ca et Ni .*

- Ils servent à la pénétration des mêmes ions dans la cellule.
- Ils sont sensibles aux mêmes ions monovalents K^+ , Na^+ , Li^+ .
- Ils sont saturés par les mêmes concentrations de Ni^{++} .
- Ils sont sensibles aux inhibiteurs des groupes SH.
- Les 2 phénomènes liés au fonctionnement de ces chenaux dépendent d'un même antagonisme entre le Ca^{++} et le K^+ .
- Ils possèdent des éléments structuraux identiques.
- Les inhibiteurs de synthèse protéique, la ribonucléase, les enzymes protéolytiques qui inhibent fortement la pénétration du Ni^{++} n'ont pas d'effet sur l'excitabilité.
- La durée de vie de certains éléments des chenaux Ni et Ca est différente.
- les anomalies qui affectent de façon importante la translocation du Ni^{++} n'ont pas toujours un effet aussi drastique sur celle du Ca^{++} .

2°) *Le chenal Ca et le chenal Ni : un chenal unique à voies multiples*

Les 2 types de chenaux possèdent un ensemble de propriétés communes si important (même ions qui les utilisent, saturation par la même concentration de Ni^{++} , même sensibilité aux ions monovalents, éléments structuraux identiques) qu'une seule explication est plausible : ces 2 chenaux sont identiques. Mais à l'intérieur du chenal, l'identité des voies suivies par chacun des 2 ions n'est pas totale.

Le chenal apparaît donc comme un édifice à sites multiples, sites dont les affinités respectives pour chacun des ions qui les empruntent sont différentes.

Le Ni^{++} est un marqueur du chenal calcique membranaire. Il permet d'étudier séparément le fonctionnement de ce chenal, de l'isoler spécifiquement parmi tous les mécanismes qui constituent le système d'excitation de la cellule.

3°) *Comparaison des perméabilités respectives du chenal pour les ions Ca^{++} et Ni^{++}*

Le chenal Ca possède au repos une perméabilité voisine au Ca^{++} et au Ni^{++} avec toutefois une préférence pour le Ca^{++} .

Au moment de l'excitation, il devient très perméable au Ca^{++} comparativement au Ni^{++} . La voie calcique est très fortement privilégiée et, pratiquement, seul cet ion ou ceux qui utilisent cette voie (Ba^{++} , Sr^{++}) peuvent emprunter le chenal.

IV - *STRUCTURE ET FONCTIONNEMENT DU CHENAL CALCIQUE D'APRES L'ETUDE DE LA REGULATION DE LA PERMEABILITE AU Ni^{++}*

1°) *Types de renseignements concernant le système d'excitation susceptibles d'être apportés par l'étude de la perméabilité au Ni^{++} .*

2°) *Les grandes composantes structurales et fonctionnelles du chenal calcique*

Le chenal calcique comporterait plusieurs unités portant des sites différents dont les affinités pour les différents ions seraient variables. Ces unités sont organisées en au moins 3 éléments fonctionnels.

- Un récepteur situé à la face externe de la membrane capable de capter plusieurs ions divalents différents (Ca^{++} , Ba^{++} , Sr^{++} , Ni^{++} , Co^{++} , Mg^{++} , Mn^{++}). Ces ions entrent en compétition pour l'occupation de ce récepteur.

- Un chenal par lequel ces ions migrent ensuite dans la cellule. Sa paroi est formée de plusieurs unités portant des sites présentant des affinités différentes pour les différents ions. Il en résulte que les voies suivies par les ions dans ce chenal sont différentes, tantôt superposées, tantôt complètement séparées.

- Un système régulateur ou "gating mechanism" dont le rôle est de moduler le fonctionnement des sites précédents donc de moduler les flux ioniques empruntant le chenal. Ces unités agissent en modifiant la conformation des sites de translocation des ions. Elles portent des sites allostériques fixant d'autres ions (Ca^{++} , K^+ , Na^+ , Rb^+ , Ba^{++}). Un antagonisme existe au niveau de ces sites entre le Ca^{++} et les autres. De la quantité de Ca^{++} fixée sur eux dépend l'état de conformation du système. Il est possible de découpler les unités de régulation des unités de la paroi du chenal et d'inhiber ainsi la modulation des flux ioniques qui l'empruntent.

3°) Les processus importants préparant la réponse calcique

- a) Le changement de conformation du chenal.
- b) Le découplage du "contrôle actif" par la membrane sur le passage des ions
- c) L'orientation du système vers la voie préférentielle calcique.

4°) Hypothèse sur "l'ouverture" du chenal calcique

Le processus d'"ouverture" des chenaux calcique pourrait donc être décrit ainsi : sous l'action d'un stimulus, les unités de régulation du système d'excitation subissent un changement de conformation transmis aux sites de translocation des ions de la paroi du chenal par une transition allostérique; la conformation de ces sites est modifiée; leur affinité et leur saturabilité pour les ions changent; une activation des sites Ca^{++} et une inhibition des sites Ni^{++} se produisent au-delà d'un certain seuil; le Ca^{++} peut alors pénétrer rapidement et préférentiellement dans la cellule d'où la réponse calcique et le renversement cilaire.

V - CONCLUSION

CHAPITRE V : ESSAI DE RECHERCHE DE COMPOSANTES BIOCHIMIQUES IMPLIQUEES DANS LE CONTROLE DE LA PERMEABILITE AU Ni^{++} ET L'EXCITABILITE DE LA MEMBRANE DE *PARAMECIUM TETRAURELIA*

I - INTRODUCTION

II - RECHERCHE D'ATPases IMPLIQUEES DANS LES MOUVEMENTS IONIQUES TRANSMEMBRANAIRES.

1°) Mise en évidence de Ca, Mg et Ba-ATPases dans les extraits totaux de *Paramécies*.

2°) Absence de Na, K et Ni-ATPases.

3°) Localisation de la Ca-ATPase .

La Ca-ATPase mise en évidence chez *Paramecium tetraurelia* est une ATPase membranaire facilement solubilisable

III - MISE EN EVIDENCE DE CHOLINESTERASES CHEZ *PARAMECIUM TETRAURELIA*

1°) Hydrolyse des esters de la choline par les extraits totaux de *Paramecium tetraurelia* .

Les extraits totaux de *Paramecium tetraurelia* contiennent une (ou des enzymes) hydrolysant les esters de la choline et préférentiellement l'acétylthiocholine.

2°) Action des inhibiteurs des cholinestérases sur l'activité enzymatique observée

3°) Nature de l'enzyme mise en évidence.

L'enzyme observée possède à la fois :

- des propriétés typiques d'une acétylcholinestérase
- des propriétés de cholinestérases non spécifiques

4°) Localisation cellulaire de l'acétylcholinestérase observée .

L'activité acétylcholinestérasique est entièrement associée aux corps cellulaires. Les cils ne renferment pas cette enzyme

IV - CONCLUSIONS

CONCLUSIONS GENERALES

L'existence de 2 compartiments de fixation du Ni^{++} radioactif (l'un d'échange rapide, l'autre d'échange lent), l'observation d'un effet des chélatants, sur la restauration des mouvements ciliaires inhibés par cet ion, parallèle à leur capacité à franchir la membrane cellulaire, les caractéristiques particulières de l'effet du Ni^{++} sur les modèles de Paramécies dépourvus de membrane physiologiquement active, l'obtention d'hyper-résistances à cet ion sous l'action d'inhibiteurs du métabolisme, la révélation de sites internes où il peut se fixer, l'étude de mutants monogéniques possédant en même temps une anomalie membranaire connue et une anomalie de résistance au Ni^{++} , montrent en effet que cet ion, d'abord adsorbé à la surface de la membrane, traverse ensuite celle-ci avant de se fixer à l'intérieur de la cellule sur des sites spécifiques dont l'occupation a pour effet d'inhiber le mouvement ciliaire.

Les mouvements ioniques transmembranaires sont préférentiellement orientés de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. La vitesse de pénétration de l'ion est plus de 100 fois supérieure à sa vitesse de sortie. Les mesures des quantités de Ni^{++} radioactif présentes au moment de l'arrêt des cils, des concentrations actives sur les modèles de Paramécies indiquent un taux d'accumulation dans la cellule de l'ordre de 500. Mais ce compartiment interne n'est pas constitué par des ions libres, car aucune action de ceux-ci n'est observée sur le potentiel de membrane. Cette dernière joue un rôle essentiel dans ce phénomène de concentration, car sa suppression, par traitement par le Triton X-100, entraîne l'impossibilité pour les modèles d'accumuler le Ni^{++} . Une simple diffusion passive, sous l'action du gradient électrochimique, ne permet pas d'expliquer les mouvements ioniques. Un mécanisme particulier facilitant la pénétration du Ni^{++} , orienté de l'extérieur vers l'intérieur est nécessaire.

Ce mécanisme possède les caractères d'un système de transport :

- saturabilité entraînant une vitesse maximum de pénétration du Ni^{++} ,

- spécificité révélée par l'observation d'une compétition entre les ions Co^{++} , Ca^{++} et Ni^{++} pour l'occupation de sites communs de translocation,
- présence de protéines assurant le passage du Ni^{++} .

En effet, des interventions au niveau des gènes (mutations), de la synthèse des ARN et des protéines (inhibiteurs spécifiques), des ARN (lyse *in vivo* par la ribonucléase) des protéines (lyse par les protéases) provoquent des hyper-résistances au Ni^{++} . La translocation de celui-ci est donc dépendante des synthèses protéiques. Sept gènes indépendants, non liés, non épistatiques, dont les effets sont additifs sur la résistance, ont été pour l'instant mis en évidence grâce à des croisements effectués entre les souches Nir 10, Nir 16p, Nir 16G, Nir 96, Pawn A, Pawn B, Pawn C. L'effet du pH et de la t° , les courbes de cinétique de pénétration de l'ion observées (hyperbole équilatère de type michaélien, sigmoïdes), la sensibilité du système à des inhibiteurs de groupes SH qui suppriment l'effet antagoniste du K^+ sur la translocation du Ni^{++} et la transformation des cinétiques de type hyperbolique en type sigmoïde montrent que certaines protéines membranaires sont directement impliquées dans le contrôle de la pénétration du Ni^{++} .

Bien que lié au métabolisme énergétique - l'inhibition de celui-ci à différents niveaux réduisant fortement la perméabilité au Ni^{++} - ce transport ne semble pas être un transport actif. Aucune ATPase activée par cet ion n'a pu être mise en évidence. L'intervention de l'ATP est probablement indirecte. L'effet des inhibiteurs de la phosphorylation oxydative, de ceux des synthèses protéiques sont temporellement superposables. La carence en ATP peut donc agir en ralentissant la synthèse des protéines participant à l'édification du système.

Des sites membranaires, dépendant de gènes différents, sont impliqués, soit dans la translocation du Ni^{++} seul, soit dans celle-ci et l'excitabilité de la membrane. Plusieurs types de sites assurent ainsi le passage de l'ion. L'absence d'épistasie entre les gènes des souches polymutantes, l'effet additif de ceux-ci sur la résistance au Ni^{++} indiquent que ces gènes

s'expriment au niveau de la membrane comme des unités indépendantes dans un ensemble interdépendant pour le transport du Ni^{++} . Ces faits, associés à l'observation de modifications des cinétiques de pénétration (passage continu des hyperboles aux sigmoïdes suivant les concentrations d'ions K^+ et Ca^{++} présentes dans le milieu extérieur) pouvant être interprétées comme des changements conformationnels de type coopératif, permettent d'envisager le système comme un édifice polymérique, c'est-à-dire un chenal, dont les unités reliées entre elles sont interdépendantes.

L'inhibition compétitive de la pénétration du Ni^{++} par le Ca^{++} et inversement celle du Ca^{++} par le Ni^{++} , le blocage par ce dernier de la réponse calcique de la membrane excitée par occupation du chenal-Ca, l'observation de mutants possédant à la fois des anomalies de ce chenal et du chenal-Ni, la mise en évidence de propriétés communes aux 2 types de chenaux montrent que ceux-ci sont confondus. Le Ni^{++} peut alors être utilisé comme marqueur pour étudier l'architecture et les propriétés de ce chenal commun et le phénomène d'excitation de la membrane chez la Paramécie.

Deux grands types de mutations, entraînant les unes des anomalies de résistance au Ni^{++} (mutant Nir et Pawn B), les autres des anomalies de régulation de cette résistance par le K^+ sans anomalie de résistance (mutants Pawn A et Pawn C), indiquent que deux grandes composantes fonctionnelles constituent ce chenal :

- le chenal lui-même dont la paroi est constituée de plusieurs unités portant des sites de translocation du Ni^{++} ou du Ca^{++} et des sites impliqués dans le transport des 2 ions. Les mutations sur les premiers n'ont que peu d'effet sur l'excitabilité (mutant Nir 10). Celles sur les seconds n'ont que peu d'effet sur la translocation du Ni^{++} (mutant Pawn B). Celles des troisièmes affectent les deux (mutant Nir 16p). Les voies suivies par les ions à l'intérieur du chenal sont donc distinctes et celui-ci est un chenal multisite à voies multiples.

L'un des sites sert de récepteur à l'entrée. Les ions Ca^{++} et Ni^{++} se fixent compétitivement sur lui et migrent ensuite vers l'intérieur de la cellule à des vitesses différentes.

- le régulateur du chenal ou "gating mechanism".

Des unités non porteuses de sites de translocation des ions (mutants Pawn A et Pawn C) régulent la vitesse de translocation des ions sur les sites de la paroi. Elles peuvent fixer les ions Ca^{++} et K^+ . Le déplacement de ces ions détermine des changements conformationnels de ces unités. Par un phénomène coopératif, ceux-ci sont transmis aux sites de translocation du Ni^{++} . La cinétique de pénétration est modifiée. Le système oscille de façon continue entre deux états; l'un stabilisé par le Ca^{++} est caractérisé par les courbes de cinétique de pénétration hyperboliques; l'autre stabilisé par le K^+ , qui déplace le Ca^{++} de ces sites suivant la loi d'action de masse, est caractérisé par les courbes de cinétique de type sigmoïde. L'état de conformation du système est alors dépendant du rapport $r = \text{conc. K}^+ / \sqrt{\text{conc. Ca}^{++}}$. Il est possible de découpler le changement de conformation, sans inhiber la pénétration du Ni^{++} , à l'aide des agents inhibiteurs des groupes SH. Ceux-ci jouent donc un rôle important dans les relations entre les unités de système.

Ce changement de conformation constitue le phénomène central du processus d'excitation de la membrane. Son inhibition par le Hg^{++} ou par une mutation (mutant Pawn A) entraîne l'inexcitabilité par perte de la réponse calcique. Il provoque le découplage du contrôle exercé par la membrane au repos sur la pénétration du Ca^{++} et privilégie l'affinité du chenal pour le Ca^{++} par rapport au Ni^{++} . Chenal à voies multiples au repos, il devient ainsi lors de l'excitation un chenal à voie unique : la voie calcique. Le Ca^{++} peut pénétrer brusquement dans la cellule et provoquer le renversement ciliaire.

Une Ca-ATPase observée dans les extraits totaux de Paramécies, concentrée surtout dans les cils et la membrane de ceux-ci permet de restau-

rer la concentration normale en ions Ca^{++} libres dans la cellule ($< 10^{-6}\text{M}$).

L'absence dans les cils d'une acétylcholinestérase atypique observée dans les corps cellulaires de la Paramécie indique que cette enzyme n'est pas impliquée dans le changement de perméabilité de la membrane au cours de l'excitation.

Les propriétés du système découlent non seulement de celles de chacune des composantes mais aussi de celles de l'ensemble architectural ainsi constitué. L'assemblage des unités et leurs relations ont autant d'importance que le fonctionnement de chacune d'elles. Les effets coopératifs jouent un rôle essentiel dans la réponse calcique. Nos résultats apportent donc des arguments à l'hypothèse émise par CHANGEUX, THIERY, TUNG et KITTEL (1967), et développée par CHANGEUX (1968); KILKSON (1968), WYMAN.

Actuellement, la nature biochimique exacte des différentes unités n'est pas déterminée. Leurs propriétés permettent de penser qu'elles sont de nature protéique. Le rôle des lipides dans le système doit être aussi envisagé, des interventions sur eux provoquant la réponse calcique de la Paramécie (BROWNING et NELSON 1976b). Au niveau moléculaire, la nature exacte du changement de conformation ne peut être déterminée par nos expériences mais on peut envisager une modification de l'orientation de molécules ou de sites intramoléculaires compatible avec l'hypothèse originellement émise par HODGKIN et HUXLEY (1952) (réorientation de molécules chargées) et vérifiée par la mise en évidence des "gating currents" des canaux sodiques (ARMSTRONG et BEZANILLA 1973; KEYNES et ROJAS 1974; MEVES, SHAW et VOGEL 1974).

BIBLIOGRAPHIE: 237 références

VOL. II RESULTATS EXPERIMENTAUX

PROTOCOLE EXPERIMENTAL I	Page 1
- Action du pH et de la température sur la résistance au Ni^{++} .	
PROTOCOLE EXPERIMENTAL II	5
- Mesure de la vitesse d'élimination du Ni radioactif fixé par des échantillons de <i>Paramecium caudatum</i> .	
PROTOCOLE EXPERIMENTAL III	15
- Levée de l'inhibition des mouvements ciliaires due au Ni^{++} , grâce à des complexants de cet ion.	
PROTOCOLE EXPERIMENTAL IV	19
- Action du Ni^{++} sur des modèles de Paramécies extraits au Triton X-100.	
PROTOCOLE EXPERIMENTAL V	25
- Absorption du Ni^{++} par <i>Paramecium caudatum</i> .	
PROTOCOLE EXPERIMENTAL VI	35
- Etude de l'antagonisme du Ca^{++} et du K^+ vis à vis du Ni^{++} chez <i>Paramecium caudatum</i> .	
PROTOCOLE EXPERIMENTAL VII	43
- Influence du cobalt et du calcium sur la cinétique de pénétration du nickel chez <i>Paramecium caudatum</i> de type P _K .	
PROTOCOLE EXPERIMENTAL VIII	48
- Les manifestations de l'antagonisme entre le Ca^{++} et le K^{++} sur la pénétration du Ni^{++} chez <i>P. caudatum</i> et <i>P. aurelia</i> .	
PROTOCOLE EXPERIMENTAL IX	59
- Action de quelques inhibiteurs du cycle de Krebs, de la chaîne respiratoire et de la phosphorylation oxydative sur la résistance au Ni^{++} chez <i>P. caudatum</i> .	
PROTOCOLE EXPERIMENTAL X	65
- Synthèse des protéines et résistance au Ni^{++} chez <i>P. caudatum</i> .	

PROTOCOLE EXPERIMENTAL XI	71
- Etude du retour à une résistance au Ni^{++} normale chez des <i>P. caudatum</i> préalablement traitées par la ribonucléase ou une enzyme protéolytique.	
PROTOCOLE EXPERIMENTAL XII	77
- Action des inhibiteurs des groupes SH sur la résistance au nickel chez <i>Paramecium caudatum</i> .	
PROTOCOLE EXPERIMENTAL XIII	85
- Action du Ni^{++} sur le renversement ciliaire chez <i>P. caudatum</i> .	
PROTOCOLE EXPERIMENTAL XIV	95
- Mise en évidence des sites intracellulaires de fixation du nickel chez <i>Paramecium tetraurelia</i> .	
PROTOCOLE EXPERIMENTAL XV	103
- Isolement, caractérisation et analyse génétique de mutants résistant au nickel.	
PROTOCOLE EXPERIMENTAL XVI	133
- Etude, à l'aide de mutants à comportement anormal, des rapports entre la perméabilité au nickel et l'excitabilité chez <i>Paramecium tetraurelia</i> .	
PROTOCOLE EXPERIMENTAL XVII	151
- Recherche des ATPases activées par les ions Ca^{++} , Mg^{++} , Ba^{++} , Ni^{++} , K^+ et Na^+ chez <i>Paramecium tetraurelia</i> .	
PROTOCOLE EXPERIMENTAL XVIII	166
- Recherche et caractérisation de cholinestérases chez <i>Paramecium tetraurelia</i> .	

